

# Structures and Formation Mechanisms of Abnormal Cross-links in Elastin(**エラスチンの異常架橋の構造とその生成機構に関する研究**)

著者	梅田 英幸
号	681
発行年	2000
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/16203">http://hdl.handle.net/10097/16203</a>

氏 名(本籍)	うめ だ ひで ゆき 梅 田 英 幸
学 位 の 種 類	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 6 8 1 号
学位授与年月日	平 成 13 年 3 月 26 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻	東北大学大学院農学研究科食糧科学専攻 (博士課程)
学位論文題目	Structures and Formation Mechanisms of Abnormal Cross-links in Elastin (エラスチンの異常架橋の構造とその生成機構に関する研究)
論文審査委員	(主 査) 教 授 須 山 享 三 教 授 古 川 勇 次 教 授 大久保 一 良

# 論文内容要旨

## 緒言

血管、肺、靱帯など、生体内で弾性を必要とする組織、臓器が生理的に働くために必要な弾性線維の主成分であるエラスチンは、高濃度存在するリジン由来の架橋構造と、高度な疎水性ペプチド配列を有した特異的な細胞外マトリックスタンパク質であることが知られている(1)。特に、エラスチンの特性発現には4級のピリジニウム環式架橋であるデスモシンおよびイソデスモシンの存在が重要である(2-4)。エラスチン架橋構築の初期段階は、リジルオキシダーゼによるリジン残基の酸化脱アミノ化反応により、アルデヒドを持つアリシンが生成することから開始され(5)、1級アミン触媒下でのアリシン残基のアルドール縮合反応によるアリシン-アルドールの生成(6)、およびアリシン残基のアルデヒドとリジン残基の $\epsilon$ -アミノ基の間でのアミノカルボニル反応によるシッフ塩基架橋であるデヒドロリジノールロイシンが生成する(7)。その後、脱水および縮合反応を繰り返すことによって、デスモシンおよびイソデスモシンといった架橋アミノ酸が生成し(Fig.1)、高度な架橋構造を構築する(8,9)。

エラスチンは動脈壁をはじめ、項靱帯、肺、皮膚など弾性を必要とする結合組織に広く存在し、量的にはコラーゲンについで多く存在する。特に、動脈におけるエラスチンの存在はその伸縮性と形態の保持や血流に対する力学的強度に寄与しているため、エラスチンが損傷されると様々な疾病を引き起こすことになる。他の細胞外マトリックスタンパク質とは違って、エラスチンは誕生後、発達段階の組織においてほとんど全てが合成され、成熟後は代謝回転が極めて遅いため、加齢および病的な状態では質的および構造的変化を受けると考えられている。しかし、現在まで、エラスチンそのものの量的な変化以外の研究は行われていない。

本研究では、エラスチンより分離、同定した4つの新規な架橋アミノ酸(デスモピリジン、イソデスモピリジン、オキシデスモシン、イソオキシデスモシン, Fig.2)が、構造的解釈から生体内において異常を示す異常架橋であると考えられたため、その構造と生成機構の解明を行った。

## 第一章 エラスチン架橋構造構築の出発物質であるアリシンの定量法の開発

エラスチン架橋構築の初期段階は、リジロキシダーゼによるリジン残基の酸化的脱アミノ化反応により、アルデヒドを持つアリシンが生成することから開始されるが、現在まで確実な定量法は開発されておらず、エラスチン架橋研究の障害となってきた。

そこで本章では、アリシンの HPLC による定量法を開発を行った。

### 1.1) *p*-cresol によるアリシンの誘導体化

1 分子のカルボニル化合物と 2 分子のフェノール化合物の酸条件下での脱水縮合反応は、ビスフェノール A の生成反応としてよく知られている。ビスフェノールによる定量化の方法は本研究室で開発されたが (10)、本研究では本法を改良して *p*-クレゾールを用いることにより、酸加水分解の条件下 (6N HCl, 110°C, 48h) でアリシン-ビス-*p*-クレゾール誘導体 (2-amino-6,6-bis (2-hydroxy-5-methylphenyl) hexanoic acid, APC) を定量的に生成する事が明らかにできた (Fig.3)。

### 1.2) APC の HPLC による分析

UV スペクトルから APC は、282.2nm に吸収極大値を持つことから、UV 検出による HPLC によってアリシンの定量、分析が可能となった。種々の分析条件を検討した結果、Fig.4 に示した分析条件を設定した。

### 1.3) アリシンの誘導体化反応の最適化

アリシンの *p*-クレゾールによる誘導体化は、酸加水分解の条件下 (6N HCl, 110°C) で行った。反応条件 (反応時間、*p*-クレゾール濃度) を検討した結果、Fig.4 に示した反応条件がアリシンを誘導体化するための最適条件であることが分かった。本法による標品 APC の分析では、検出限界値は 58 pmol/ 20μl injection, 定量限界値は 115 pmol/ 20μl injection であり、また項靱帯エラスチン 5~200 mg の範囲で非常に定量性の良い結果が得られた (Table 1)。

### 1.4) 牛組織エラスチンにおけるアリシン含量

本法により、牛項靱帯、大動脈、肺のエラスチンを分析した結果、アリシンは項靱帯の多く、ついで大動脈、肺の順に存在しており、その存在量は成熟架橋であるデスモシン

の約3倍、イソデスモシンの約4倍であった (Table 2)。

### 1.5) ラット大動脈エラスチンにおけるアリシン含量の加齢変化

本法により、ラット大動脈エラスチンにおけるアリシン含量を分析した結果、離乳前後 (1週齢～2週齢) に急激に増加し、その後加齢と共に減少した (Fig.5)。これはアリシン合成に関わる酵素、リジルオキシダーゼの発現量の変化のパターンに類似していた (11)。

## 第二章 新規な2種のピリジン架橋、デスモピリジンおよびイソデスモピリジンの構造とその生成機構の解明

牛項靱帯エラスチンより分離した分子量 396 の新規な2種の架橋アミノ酸を分離した。各種 NMR 分析の結果から、それぞれ 3,4,5-, 2,3,5-に分岐したピリジン骨格を有しており、デスモシン、イソデスモシンに構造が類似しているピリジン環架橋構造をもつ事が明らかとなり、デスモピリジン (DESP)、イソデスモピリジン (IDP) と名付けた (Fig.6)。

### 2.1) デスモピリジン、イソデスモピリジンの分離および同定

DESP および IDP は、各種 NMR 分析の結果から、それぞれ 4-(4-amino-4-carboxybutyl)-3,5-di-(3-amino-3-carboxypropyl)-pyridine, 2-(4-amino-4-carboxybutyl)-3,5-di-(3-amino-3-carboxypropyl)-pyridine と同定した (Fig.7, 8)。特にピリジン環の環プロトンのシグナルから前者と後者の構造と違いが明らかにできた。

### 2.2) デスモピリジン、イソデスモピリジンの HPLC による分析

DESP および IDP は、それぞれ 265nm、273nm に吸収極大値を持つことから、UV 検出による HPLC によって定量、分析が可能であった。種々の分析条件を検討した結果、Fig.9 に示した分析条件を最終的に設定した。

### 2.3) アリシンとアンモニアによるチチバビン反応 (Chichibabine reaction) によるデスモピリジンおよびイソデスモピリジンの生成

アルデヒド、ケトン、 $\alpha,\beta$ -不飽和アルデヒドとアンモニアの縮合反応によりピリジン化合物が生成する反応はチチバビン反応として知られている。DESP および IDP は、共に

ピリジン骨格を有しており、それぞれエラスチン成熟架橋であるデスモシン、イソデスモシンに構造が類似していることから、その生成にエラスチン架橋構築の出発物質であるアリシンとアンモニアが関わっていると推察された (Fig.6)。そこで、牛項韌帯エラスチン(50 mg)を高濃度の塩化アンモニウム(1M) と共に試験管内で反応させた。反応後のエラスチンにおけるアリシン、DESP および IDP の分析は、それぞれ Fig.4, Fig.9 に示した条件で HPLC により行った。反応後エラスチンにおける DESP および IDP 含量は、反応時間と共に徐々に増加し、アリシンは逆に減少した (Fig.10)。37℃で28日間の反応の結果、DESP および IDP はそれぞれ 0.17 nmol/mg elastin、0.44 nmol/mg elastin 増加し、アリシンは 1.87 nmol/mg elastin 減少した。DESP および IDP が Fig.6 に示したように 1 モルのアリシンと 3 モルのアンモニアのよるチチバピン反応により生成すると仮定した場合、 $0.17 \times 3 + 0.44 \times 3 = 1.83$  nmol/mg elastin のアリシンが減少すると推察され、この値は実験値と非常に近いことがわかった。60℃で14日間の反応の結果、DESP および IDP はそれぞれ 0.80 nmol/mg elastin、1.66 nmol/mg elastin 増加し、IDP/DESP 比は約 2.0 で、フェニルアルデヒドを用いたモデル反応で生成する 2,3,5- trisubstituted / 3,4,5- trisubstituted pyridine 比と一致した。

一方、四級のピリジニウム化合物の熱分解反応であるホフマン分解によってもピリジン化合物の生成する反応が知られているが、本反応による DESP および IDP の生成は起こらない事が確認された。

#### 2.4) 生体内でのデスモピリジンおよびイソデスモピリジンの生成

ラットに四塩化炭素を約4週間腹腔内注射し、肝硬変を起こさせることによって高アンモニア血症ラットを作成した。大動脈エラスチンを分析した結果、アリシン含量は低下し、IDP は有意に増加した (table 3,  $p < 0.05$ )。一方、DESP はコントロールラットおよび高アンモニア血症ラット共に検出されなかった。

#### 2.5) 牛組織エラスチンおよびヒト大動脈エラスチンにおけるデスモピリジンおよびイソデスモピリジンの分析

牛組織エラスチンにおける DESP、IDP、デスモシン(DES)、イソデスモシン(IDE)、アリシンおよびアリシンーアルドール含量を分析した結果(table 4)、DES および IDE 含量に比較すると DESP および IDP 含量はどの組織エラスチンにおいても微量であるが、大動脈に多く存在し、DESP/DES 比および IDP/IDE 比も他の組織エラスチンに比べて高値を示した。また、東北大学医学部付属病院より提供されたヒト大動脈エラスチンにおける DESP、IDP、DES、IDE、アリシンおよびアリシンーアルドール含量の加齢変化ならば

に DESP/DES 比および IDP/IDE 比の加齢変化を調べた(Fig.11)。DES、IDE、アリシンおよびアリシンーアルドールは加齢と共に減少し、DESP、IDP は加齢と共に増加した。また、DESP/DES 比および IDP/IDE 比は加齢と共に有意に増加した。

### 第三章 新規な 2 種のジヒドロオキソピリジン架橋、オキソデスモシンおよびイソオキソデスモシンの生成機構の解明

牛大動脈エラスチンより分離した分子量 465 の本研究室においてその構造が解明された新規な 2 種の架橋は、各種 NMR 分析の結果から、ジヒドロオキソピリジン骨格を有しており、デスモシン(DES)、イソデスモシン(IDE)に構造が類似していることからオキソデスモシン(OXD)、イソオキソデスモシン(IOXD)と名付けられている(12)。しかし、その生成反応は未解明であった。これら 2 種のジヒドロオキソピリジン架橋の構造的解釈から、その生成に活性酸素種であるヒドロキシラジカル( $\cdot\text{OH}$ )による酸化反応が関わっており、OXD および IOXD がそれぞれ DES および IDE の $\cdot\text{OH}$ による酸化による解裂反応の中間体であると推察された(Fig.12)。エラスチンの安定架橋である DES および IDE の活性酸素種による分解は知られていない。

#### 3.1) オキソデスモシンおよびイソオキソデスモシンの HPLC による分析

OXD および IOXD は、それぞれ 265nm、310nm に吸収極大値を持つことから、UV 検出による HPLC によって定量、分析が可能であった。種々の分析条件を検討した結果、Fig.13 に示した分析条件を設定した。

#### 3.2) 牛組織エラスチンにおけるオキソデスモシンおよびイソオキソデスモシンの分布

牛組織エラスチンにおける OXD および IOXD 含量、また OXD/DES 比および IOXD/IDE 比は、HPLC のピーク面積から相対的に定量し、その結果 OXD および IOXD 含量は項韌帯、脾臓に多く存在し、OXD/DES 比および IOXD/IDE 比は調べた大動脈において最も低いことが明らかとなった(table 5)。

#### 3.3) 金属触媒型酸化システム(metal-catalyzed oxidation system, MCO system)を用いたエラスチンの酸化によるオキソデスモシン、イソオキソ

## デスモン、デスモンおよびイソデスモン含量の変化

構造および組織分布から、OXD および IOXD の生成に活性酸素種である $\cdot\text{OH}$ による酸化反応が関わっていると推察されたために、一般に $\cdot\text{OH}$ の研究に用いられる MCO system ( $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ ) を使い牛大動脈エラスチンを酸化した。エラスチンの酸化に際し、パラメーターとして過酸化水素濃度 (table 6)、pH (table 7)、反応時間 (Fig. 14) を考慮して実験を行った。どちらの MCO system においても過酸化水素濃度の増加と共に DES および IDE 含量が減少しこれらの安定架橋の分解の起こることが確認された。また、一方、DES が IDE に比較して分解反応の起こりやすい事が明らかとなった。OXD 含量は  $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ 、すなわちフェントン反応により過酸化水素濃度の増加と共に増加する傾向が観察されたが、IOXD 含量はどちらの MCO system においても増加しなかった。これら架橋含量は反応溶液の pH に依存しており、どちらの MCO system においても明らかに酸性側で分解が進行し、中性および弱アルカリ条件下でのフェントン反応および弱アルカリ条件下での  $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$  による酸化反応により OXD 含量は増加した。また、DES および IDE 含量が減少と OXD 含量の増加は、どちらの MCO system においても反応時間に依存していることが分かった。

### 3.4) MCO system を用いたエラスチンの酸化によるオキシデスモシンの生成

3.3)の実験結果から、OXD および IOXD は共に弱酸性条件下( $\text{Cu}^{2+}$ :0.1mM,  $\text{H}_2\text{O}_2$ : 50mM, pH 6.8, 24h)での  $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$  による酸化反応により、明らかに分解が進行し、IOXD は検出されない量まで減少した。そこで、この酸化反応により得られた酸化エラスチンを用い、3.3)の実験結果から OXD 含量の増加が観察された反応条件で、再度酸化を行った(Fig. 15)。弱アルカリ条件下( $\text{Cu}^{2+}$ :0.1mM,  $\text{H}_2\text{O}_2$ : 50mM, pH 8.4, 24h)での  $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$  による酸化反応、および中性 (pH 7.4) および弱アルカリ条件下 (pH 8.4) でのフェントン反応 ( $\text{Fe}^{2+}$ :0.1mM,  $\text{H}_2\text{O}_2$ : 50mM, 24h)により微量の OXD は生成が観察されたが、IOXD はどちらの反応条件でもその生成は観察されなかった。

### 3.5) フェントン反応を用いたデスモシンの酸化によるオキシデスモシンの生成

牛項韌帯エラスチンより分離した純粋な DES を 3.3)の実験結果から OXD 含量の増加が観察された反応条件で、酸化を行った。弱アルカリ条件下( $\text{Cu}^{2+}$ :0.1mM,  $\text{H}_2\text{O}_2$ : 50mM, pH 8.4, 24h)での  $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$  による酸化反応、および中性 (pH 7.4) および弱アルカリ条件下 (pH 8.4) でのフェントン反応( $\text{Fe}^{2+}$ :0.1mM,  $\text{H}_2\text{O}_2$ : 50mM, 24h)どちらの反応条件でも



OXD の生成は観察されなかったが、反応溶液をリン酸バッファーから水に変えることにより (Fig.16 に示した反応条件下) DES から OXD が生成した。一方、IOXD が IDE から生成するという結果は得られなかった。これは IOXD が OXD に比較して酸化分解を受けやすいためと考えられた。

### 3.6) フェントン反応を用いたイソデスモシンのモデル化合物から 4-ピリドンの生成

MCO system を用いた酸化反応により、IOXD の生成が確認されなかったため、酸化反応による IOXD の生成の可能性を明らかにするために、グリシンとプロパナールから IDE のモデル化合物、1-(1-carboxymethyl)-2-ethyl-3,5-dimethyl pyridinium betaine を合成し、MCO system により酸化した。Fig.17 に示した反応条件下のフェントン反応により IOXD と同様の骨格を有した 1-(1-carboxymethyl)-2-ethyl-3,5-dimethyl-4-oxopyridine が合成されることが分かった。この結果は IDE からの IOXD の生成が起こる事を示唆している。

## 総括

1. エラスチン架橋研究の障壁となっていたエラスチン架橋構造の出発物質であるアリシンを *p*-cresol を用いた誘導体化反応により安定なビス *p*-cresol 誘導体を合成し、HPLC を用いた定量法を開発した。

2. 牛項韌帯エラスチンより分離した分子量 396 の新規な 2 種のピリジン架橋、デスモピリジン (DESP)、イソデスモピリジン (IDP) を分離し構造を決定した。生成はエラスチン架橋構築の出発物質であるアリシンとアンモニアによるチチバビン反応に関わっていることが明らかとなった。

3. 牛組織エラスチンにおいて DESP および IDP 含量は、大動脈に多く存在し DESP/DES 比および IDP/IDE 比は高値を示した。また、ヒト大動脈エラスチンにおいて DESP/DES 比および IDP/IDE 比は加齢と共に明らかに上昇したことから、大動脈エラスチンにおける DESP および IDP の存在と DESP/DES 比および IDP/IDE 比は、アンモニアによりダメージを受けたエラスチンの化学的な変化の指標となると考えられた。

4. 牛大動脈エラスチンより分離した分子量 465 の新規な 2 種のジヒドロオキソピ

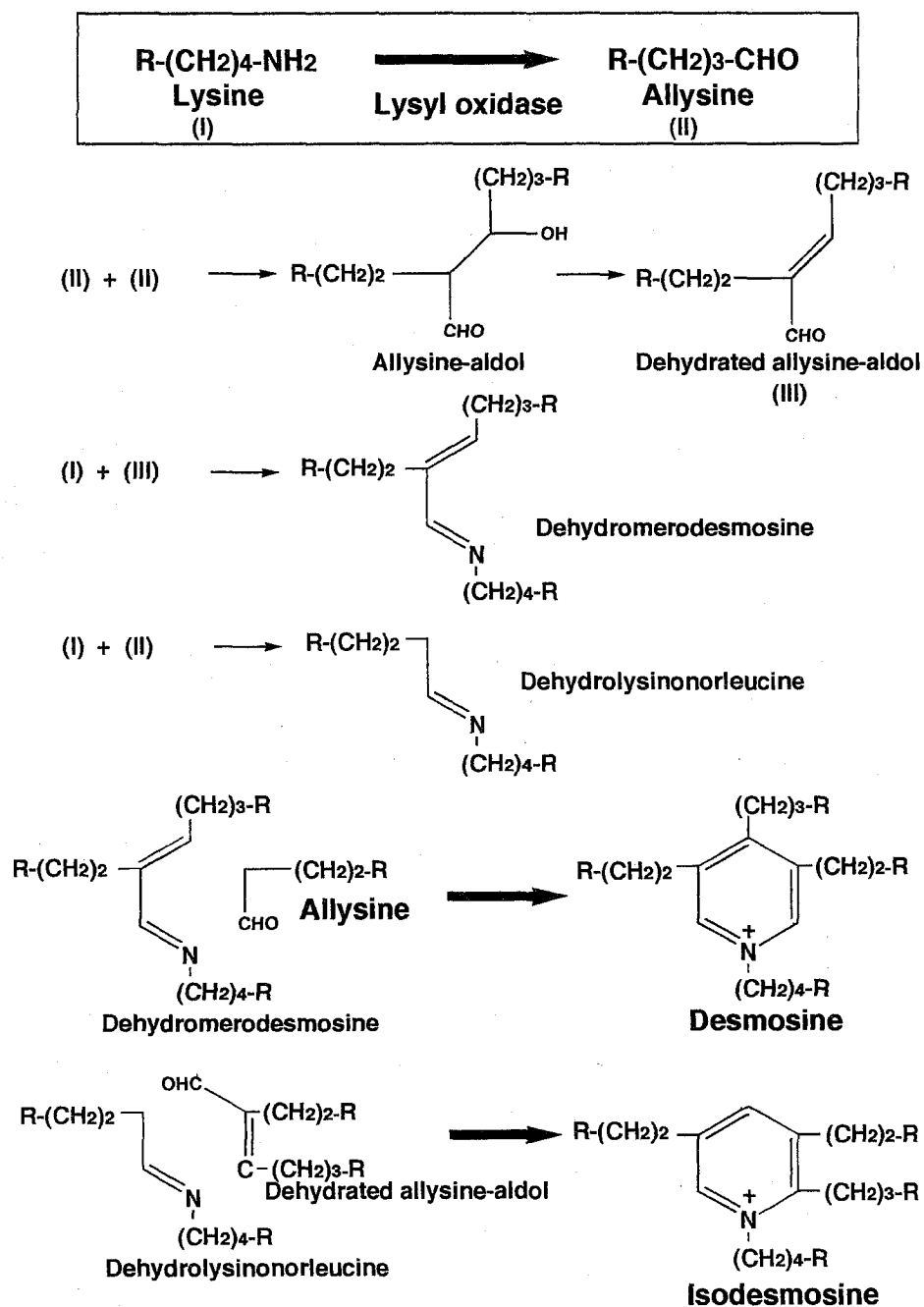
リジン架橋、オキシデスモシン (OXD) およびイソオキシデスモシン(IOXD)は、それぞれデスモシン(DES)、イソデスモシン(IDE)の $\cdot\text{OH}$  による酸化により生成するこれら安定架橋構造の解裂中間体であることが分かった。

5. 不溶性のエラスチンが  $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$  による酸化反応により、DES から OXD および IDE から IOXD といった酸化解裂過程を経由して分解が亢進し、OXD および IOXD がさらに分解されることにより、可溶化され、組織の脆弱化の一因となると考えられた。

## 引用文献

1. Rosenbloom, J., Abrams, W. R., and Mecham, R. P. (1993) Extracellular matrix 4: The elastic fiber. *FASEB J.* **7**, 1208-1218.
2. Partridge, S.M., Elsden, D.F., and Thomas, J. (1963). Constitution of the cross-linkages in elastin. *Nature* **197**, 1297-1298.
3. Thomas, J., Elsden, D.F., and Partridge, S.M. (1963). Partial structure of two major degradation products from the cross-linkages in elastin. *Nature* **200**, 651-652.
4. Anwar, R.A. and Oda, G. (1966) The biosynthesis of desmosine and isodesmosine. *J. Biol. Chem.* **241**, 4638-4641.
5. Pinnell, S.R. and Martin, G.R. (1968). The cross-linking of collagen and elastin: Enzymatic conversion of lysine in peptide linkage to  $\alpha$ -aminoadipic- $\delta$ -semialdehyde (allysine). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **61**, 708-716.
6. Lent, R., Smith, B., Salcedo, L.L., Faris, B., and Franzblau, C. (1969). Studies on the reduction of elastin. II. Evidence for the presence of  $\alpha$ -aminoadipic- $\delta$ -semialdehyde and its aldol condensation product. *Biochemistry* **8**, 2837-2845.
7. Lent, R and Franzblau, C. (1967). Studies on the reduction of bovine elastin: Evidence for the presence of  $\Delta^6,7$ -dehydrolysinonorleucine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **26**, 43- 50.
8. Davis, N. R., and Anwar, R. A. (1970) On the mechanism of formation of desmosine and isodesmosine cross-links of elastin. *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 3778-3782.
9. Akagawa M, Suyama K. (2000) Mechanism of formation of elastin crosslinks. *Connect. Tissue Res.* **4**, 131-141.
10. Jahanmard, E., Suyama, K. (2000) Bisphenol derivative of allysine for high-performance liquid chromatographic analysis of allysine residue of proteins. *J. Chromatogr. B*, **739**, 273-280.
11. Fornieri, C., Quaglino, D., and Mori, G. (1992) Role of the extracellular matrix in age-related modifications of the rat aorta. *Arteriosclerosis and Thrombosis* **12**, 1008-1016.
12. Suyama, K. and Nakamura, F. (1992) Two fluorescent crosslinking amino acids having N-substituted dihydrooxypyridine skeleton isolated from bovine elastin. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2**, 1767-1770.

## Proposed reactions for the formation of cross-links in elastin



R, side chain of amino acid

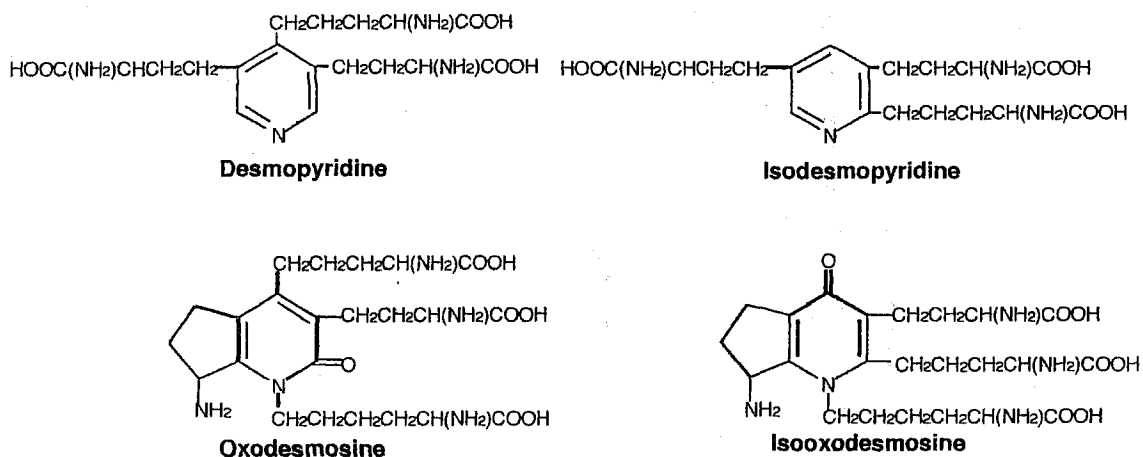


Fig. 2 Structures of abnormal cross-links in elastin.

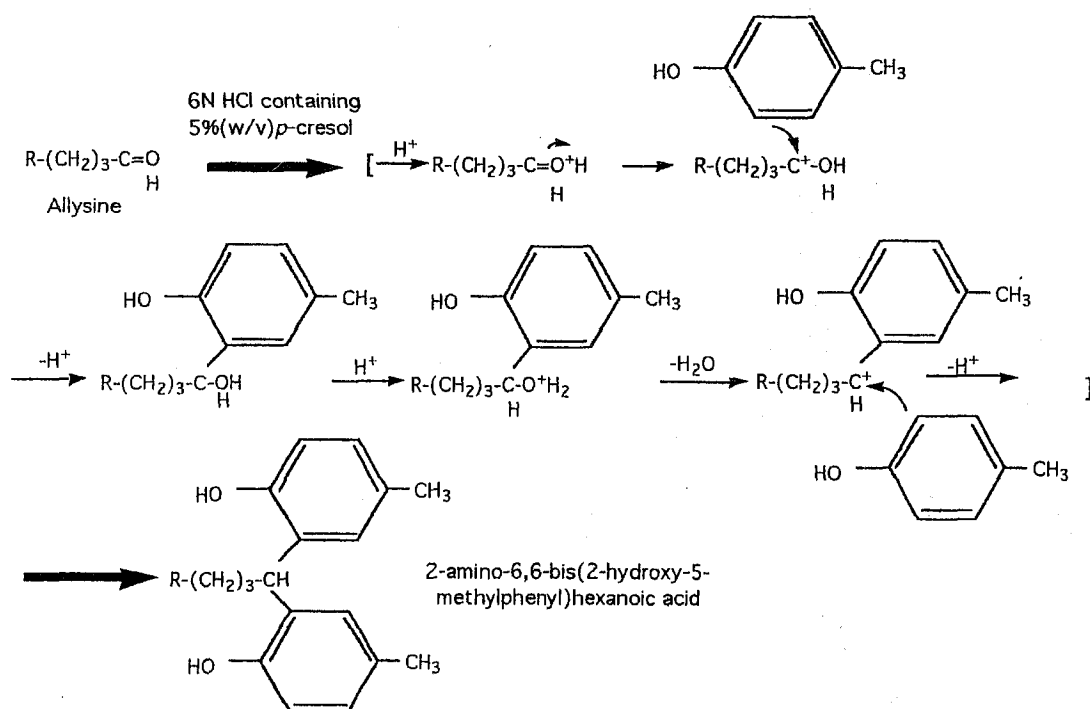


Fig.3. Derivatization reaction of allysine with *p*-cresol. R, side chain of amino acid.

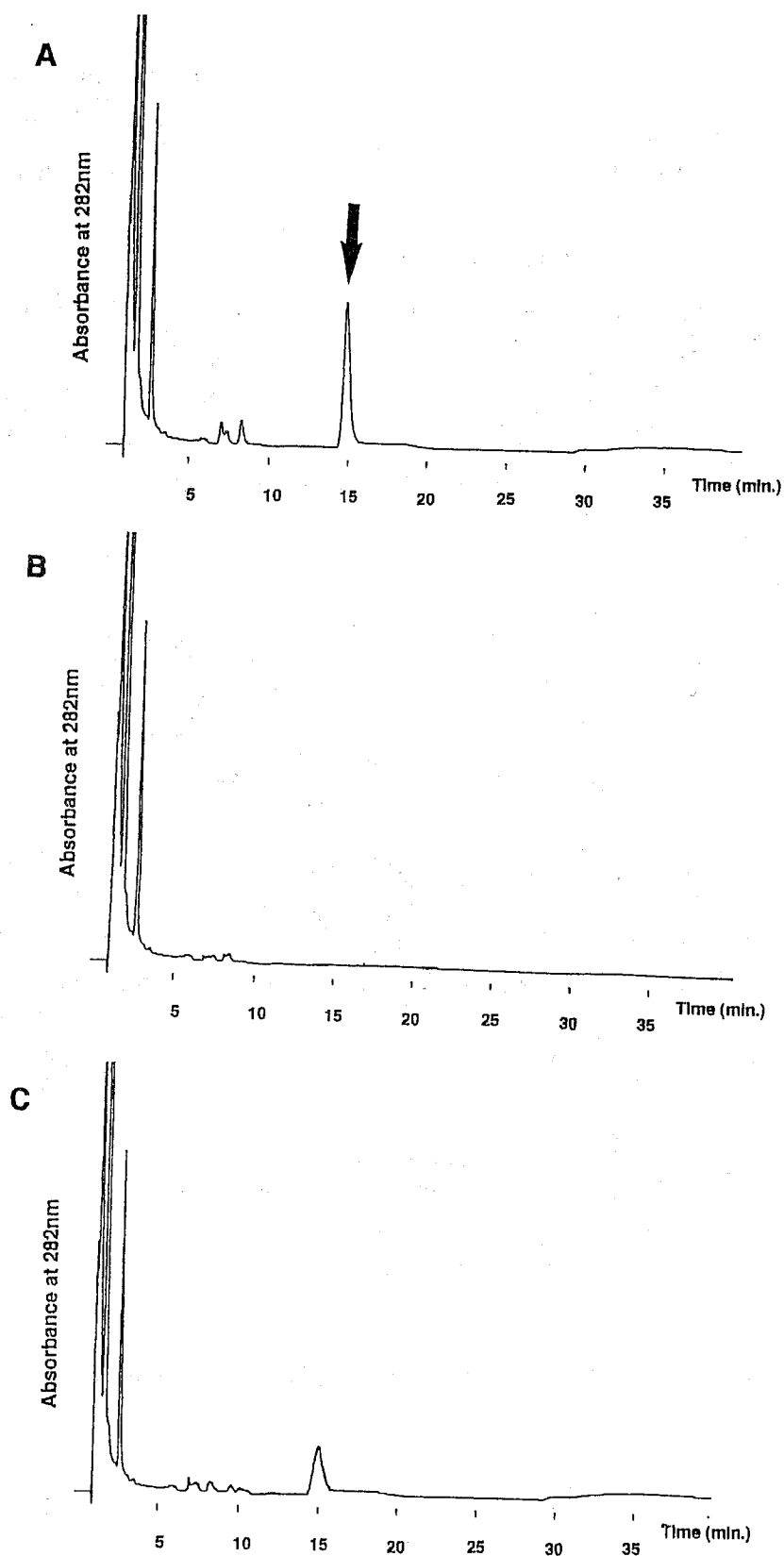


Fig.4. HPLC profiles of acid hydrolysates of bovine ligamentum nuchae elastin, with *p*-cresol (A) and without *p*-cresol (B), and of bovine ligamentum nuchae elastin reduced with sodium borohydride (C). Arrow indicates the peak of APC. Elastin was hydrolyzed in 6 N HCl containing 5 % (w/v) *p*-cresol for 48h at 110°C (A). Elastin was hydrolyzed in 6 N HCl without *p*-cresol for 48h at 110°C (B). After reduction with sodium borohydride (3), reduced elastin was hydrolyzed in 6 N HCl containing 5 % (w/v) *p*-cresol for 48h at 110°C (C). Analytical HPLC was performed with a LiChrospher 100 RP-18 125-4 reverse-phase column using a solvent of 0.05 M phosphate buffer (at pH 2.2)/acetonitrile (3:1, v/v). The flow rate was 1.0 ml/min.

TABLE 1

## Precision of the Analytical Method for Allylsine

Elastin* (mg)	Peak area (mean,n=3)	Allylsine level (nmol/mg)	RSD <sup>#</sup> (%)
5	33717	47.5±1.0	2.1
10	70203	47.0±0.7	1.5
25	181664	47.4±0.5	1.1
50	356047	46.5±0.7	1.5
100	735463	47.3±1.2	2.5
150	1108710	47.5±1.2	2.5
200	1448120	46.1±1.1	2.4

Note. Allylsine levels are expressed as nmol per mg of elastin and represents the mean± S.D. (n=3). Assay for allylsine was conducted according to the conditions in Fig.4.

\* Elastin was prepared from ligamentum nuchae by the technique with 1M NaCl treatment.

<sup>#</sup>Relative standard deviation (RSD) was used as a measure for precision of the analytical method. RSD is defined as 100×(S.D./mean).

TABLE 2

## Amount of Cross-Links in Elastin\* from Different Bovine Tissues

	Allylsine <sup>a</sup>	Desmosine <sup>b</sup>	Isodesmosine <sup>b</sup>
Ligamentum nuchae	47.4	14.2	12.1
Aorta	32.0	12.1	10.1
Lung	10.7	3.3	2.5

Note. Values are expressed as nmol per mg of elastin.

\* Elastin from bovine tissues was purified by the technique with 1M NaCl treatment.

<sup>a</sup> Assay for allylsine was conducted according to conditions of Fig.4 and "Experimental and methods".

<sup>b</sup> Desmosine and isodesmosine were quantified by the method of Nakamura and Suyama, respectively (Nakamura, F. and Suyama, K. (1994) Analysis of aldose, an amino acid derived from aldol crosslink of elastin and collagen by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **223**, 21-25.]

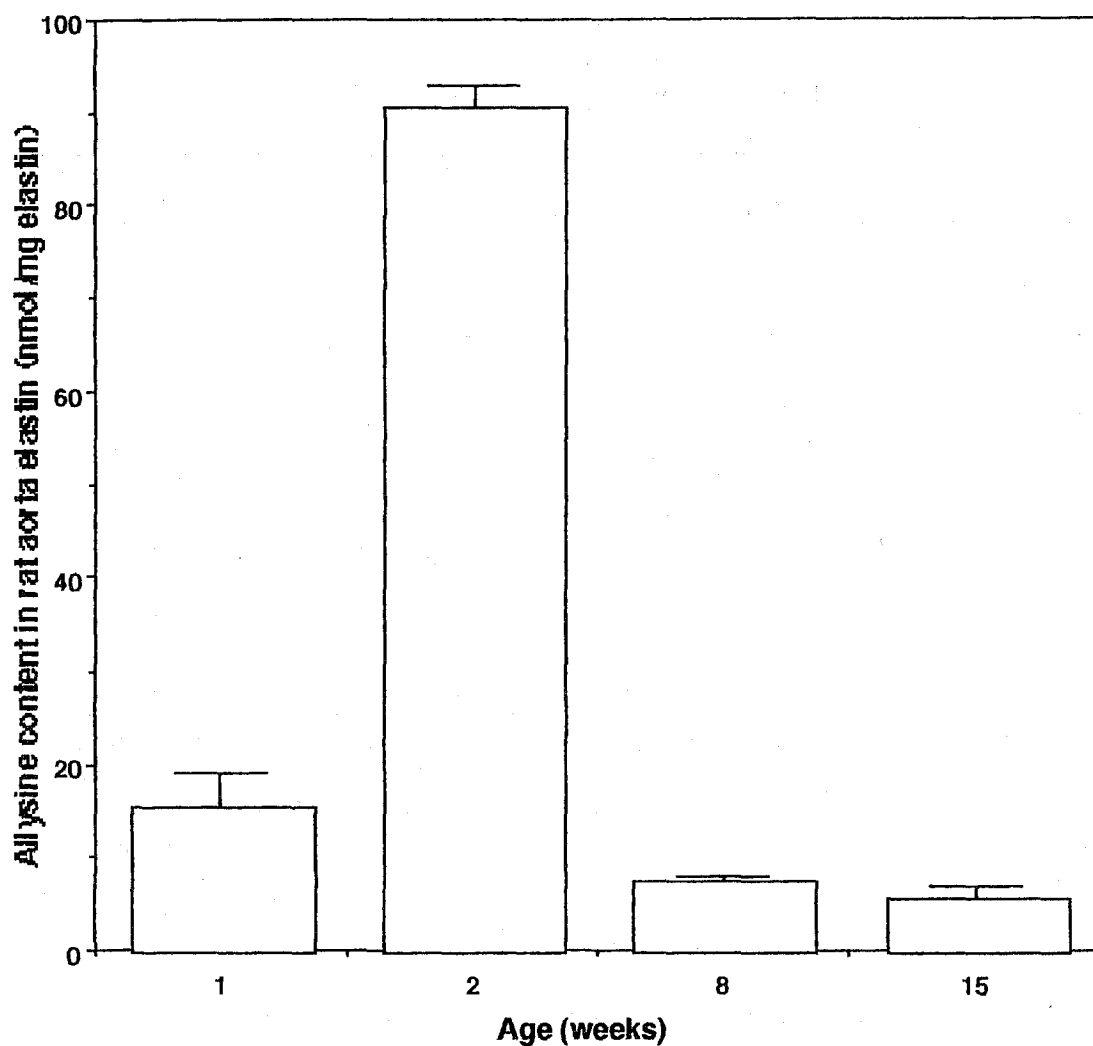


Fig.5. Change of the allysine content in rat aorta elastin with age. Assay for allysine was conducted according to conditions in Fig.4. Values shown are means  $\pm$  S.D. of three independent determinations.

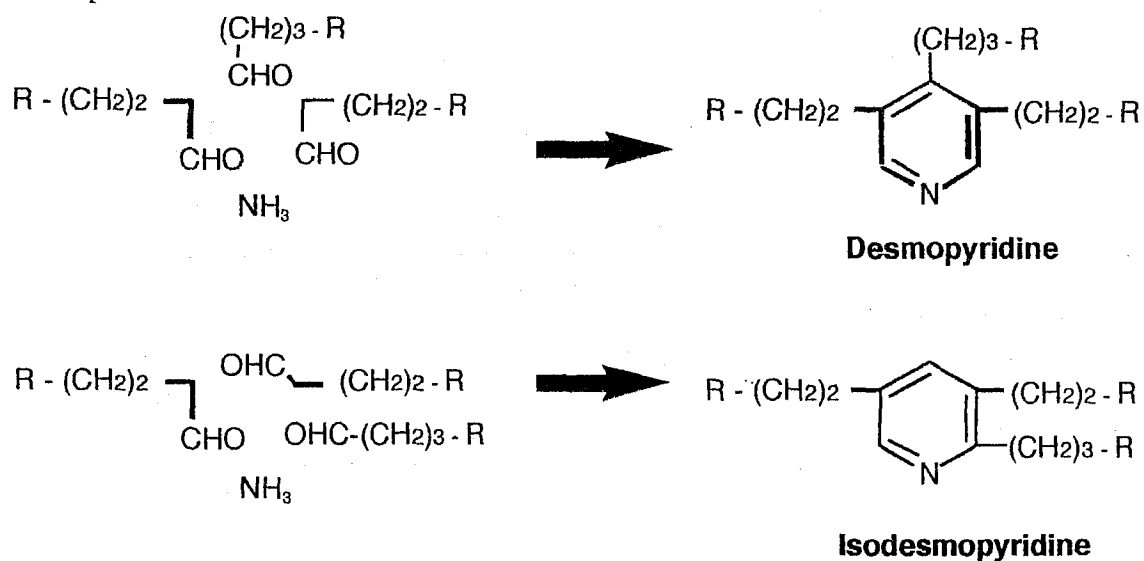


FIG. 6. The over-all reaction for the formation of DESP (upper) and IDP (lower). R, side chain of amino acid.

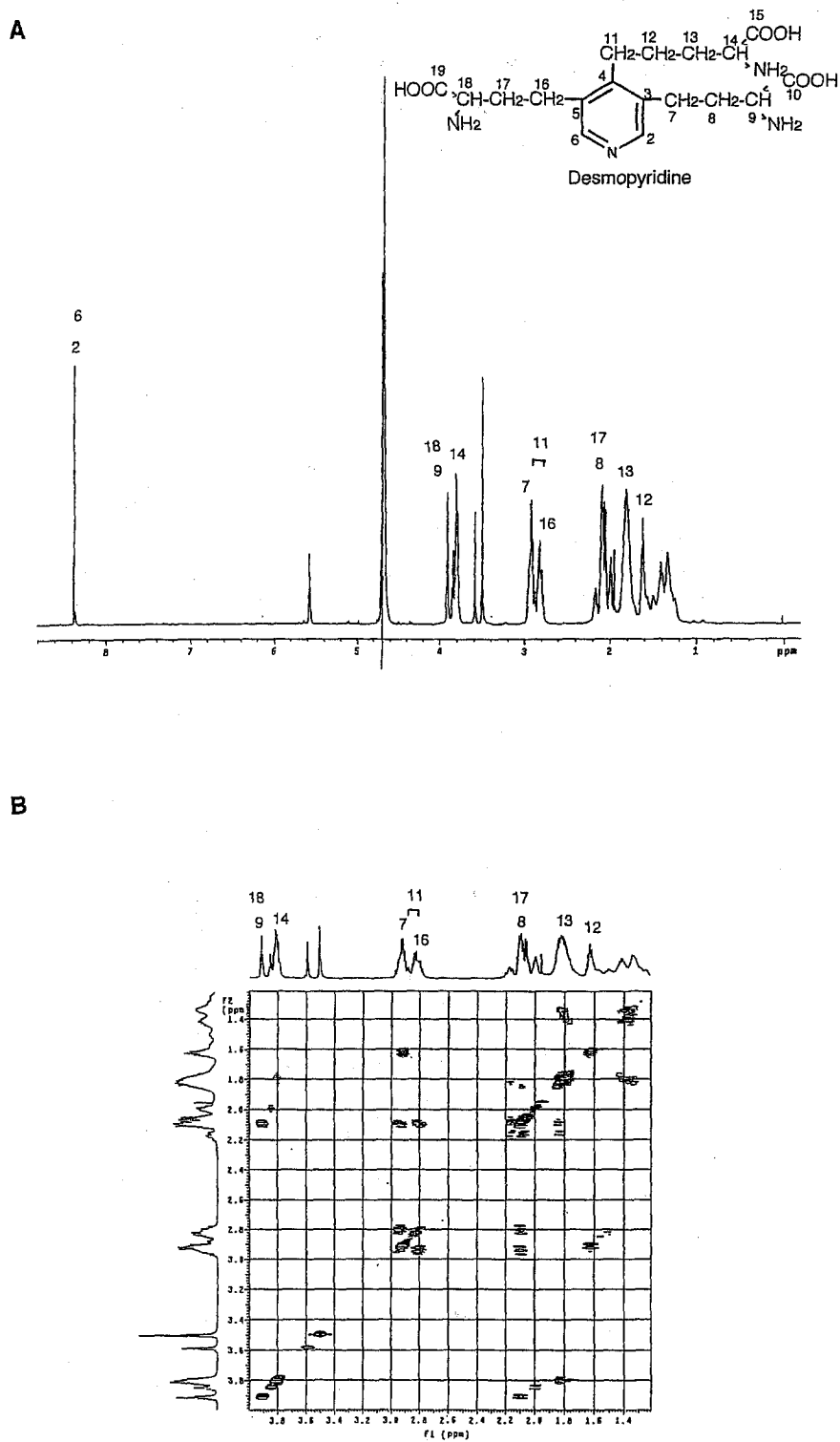
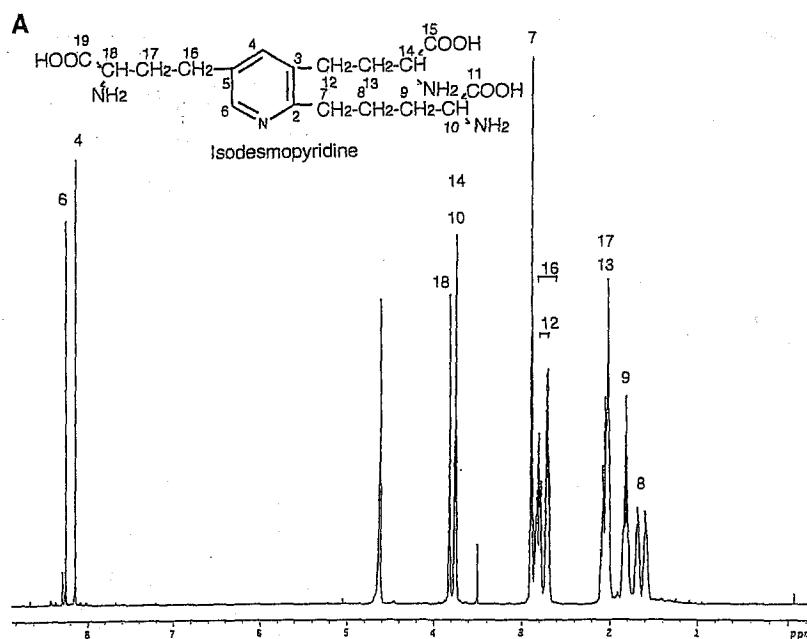


Fig. 7.  $^1\text{H}$  (A),  $^1\text{H}$  -  $^1\text{H}$  COSY (B) NMR spectra of desmopyridine.





**B**

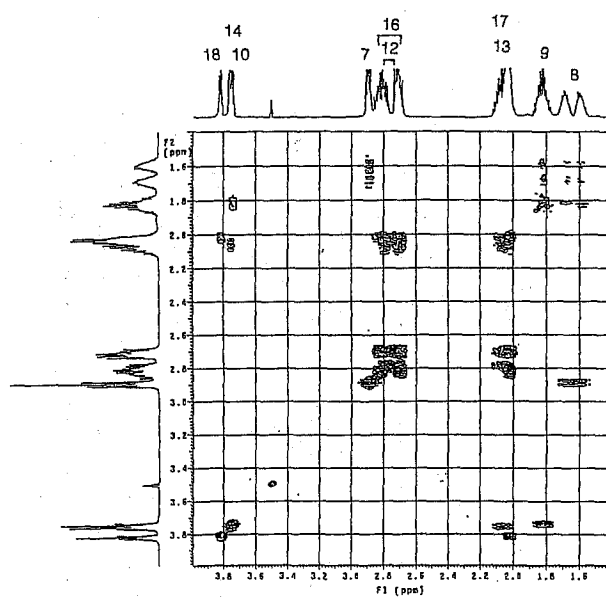


Fig. 8.  $^1\text{H}$  (A),  $^1\text{H}$  -  $^1\text{H}$  COSY (B) NMR spectra of isodesmopyridine.

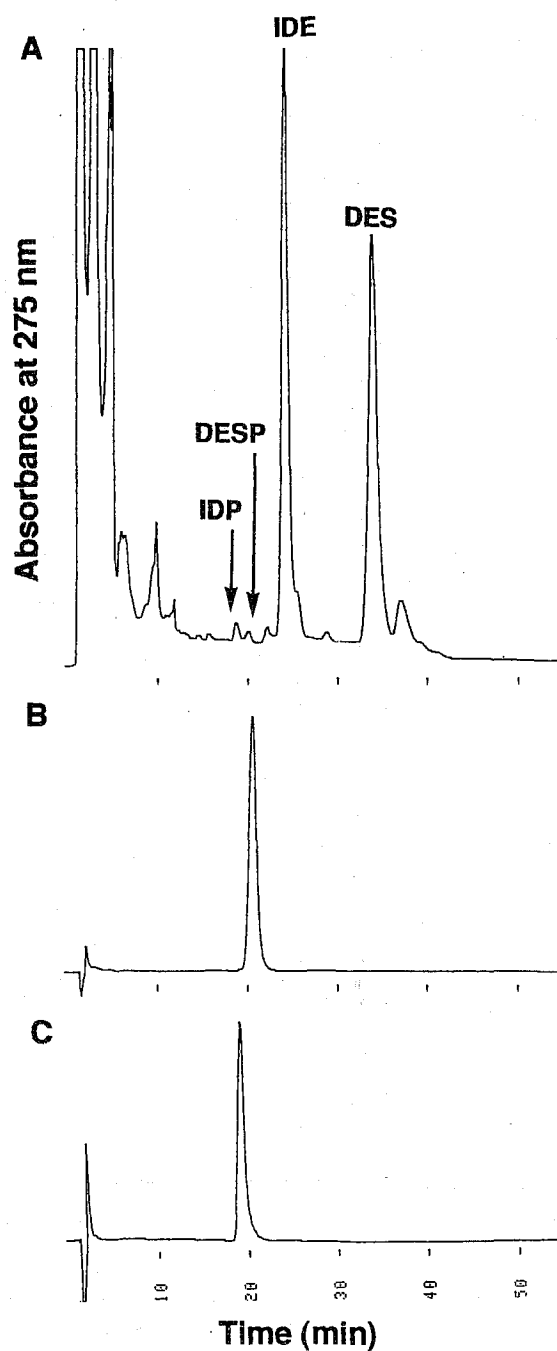


FIG. 9. Representative HPLC profiles of bovine ligamentum nuchae elastin (A), DESP (B) and IDP standards (C). Bovine ligamentum nuchae elastin was hydrolyzed in 6 N HCl. The analytical HPLC condition was performed with a reverse-phase column (Mightysil RP-18 150×4.6) using a solvent of 0.1 M sodium phosphate buffer/acetonitrile (5:1) at pH 3.6.

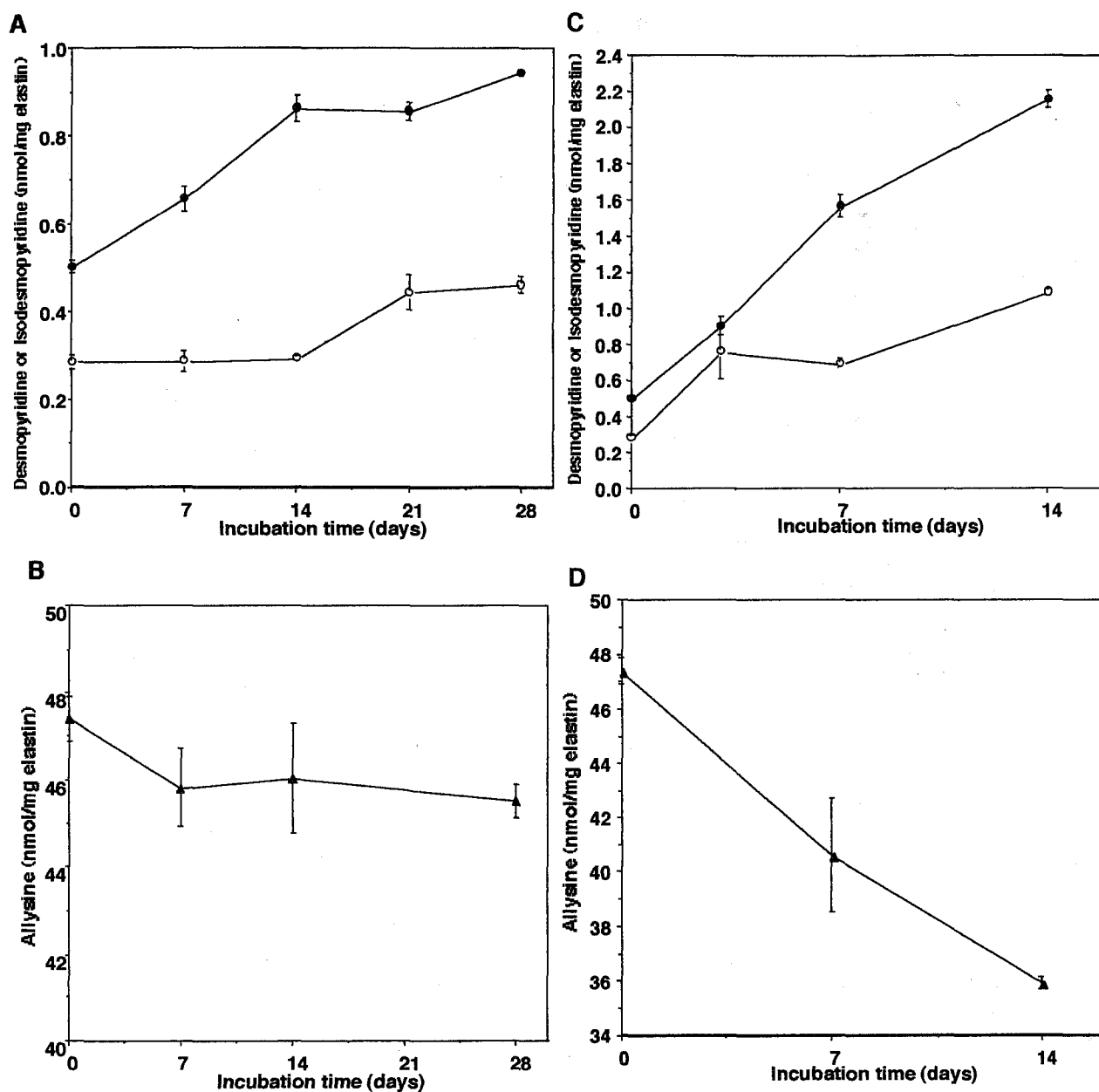


Fig. 10. Changes of DESP, IDP, and allysine in bovine ligamentum nuchae elastin (10 mg/ml) incubated with 1 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$  under physiological conditions (A, B, pH 7.4, 37°C), and at 60°C (C, D, pH 7.4). DESP (open circles), IDP (solid circles), and allysine (solid triangles) were assayed as described in Fig.9 and Fig.4, respectively. Values shown are means  $\pm$  S.D. of three independent determinations.

TABLE 3. Content of IDP and allysine  
in the aorta elastin from control and liver cirrhotic rat.

	Control	Liver cirrhosis*
IDP	5.9±1.5	11.1±0.9
Allysine	7.8±0.7	5.8±0.5

All data are expressed as nmol per mg elastin and represents the mean  $\pm$ S.D. (n=3). IDP was analyzed according to the legends of Fig. 7.

Assay for allysine was conducted according to the legends of Fig. 4.

\*Liver cirrhosis was induced in rats by repeated intraperitoneal injections of carbon tetrachloride/mineral oil (1:1) at a dose of 1 ml/kg of body weight three times a week (on Monday, Wednesday, and Friday) for a total of 10 injections .

TABLE 4  
Cross-Links and cross-link precursors in elastin from different bovine tissues

	DESP <sup>a</sup>	IDP <sup>a</sup>	Allysine <sup>b</sup>	Allysine-aldol <sup>c</sup>	DES <sup>a</sup>	IDE <sup>a</sup>	DESP/DES (%)	IDP/IDE(%)
Ligamentum nuchae	0.29	0.59	47.4	11.0	14.2	12.1	2.0	4.9
Aorta	0.55	1.02	32.0	3.21	12.9	11.0	4.5	9.3
Lung	0.11	0.41	10.7	1.17	6.57	6.03	1.7	6.8

*Note.* Values are expressed as nmol per mg of elastin. The value in the table represent the average of triplicate assays for three samples.

<sup>a</sup> Assays for DES, IDE, DESP, and IDP were conducted according to the condition of Fig. 7.

<sup>b</sup> Assay for allysine was conducted according to conditions described in Fig.4.

<sup>c</sup> Assay for allysine-aldol was quantified by the method of Nakamura and Suyama [Nakamura, F. and Suyama, K. (1994) Analysis of aldosterone, an amino acid derived from aldol crosslink of elastin and collagen by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **223**, 21-25. ]

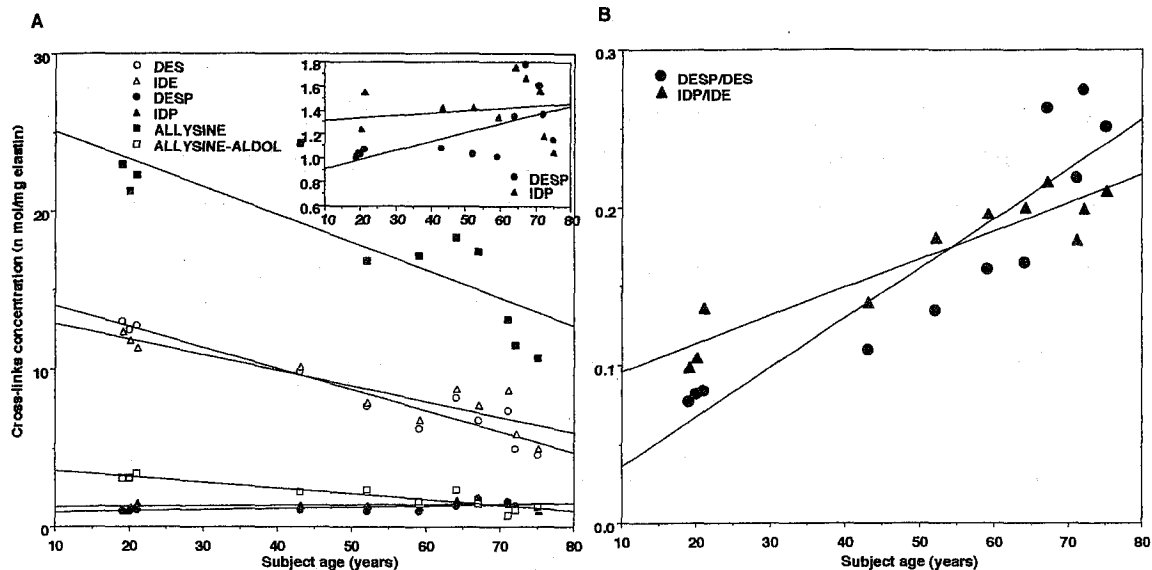


Fig. 11. Cross-links and cross-link precursors contents (A) and DESP/DES and IDP/IDE ratios (B) in human aorta elastin as a function of age. The inset (A) shows the enlarged view of age-related changes of DESP and IDP. Measurements of DES, IDE, DESP and IDP were conducted as described in the legends of Fig. 9. The assays for allysine was conducted as described in the legends of Fig. 4. Allysine-aldol was quantified by the method of Nakamura and Suyama [Nakamura, F. and Suyama, K. (1994) Analysis of aldol, an amino acid derived from aldol crosslink of elastin and collagen by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **223**, 21-25.]

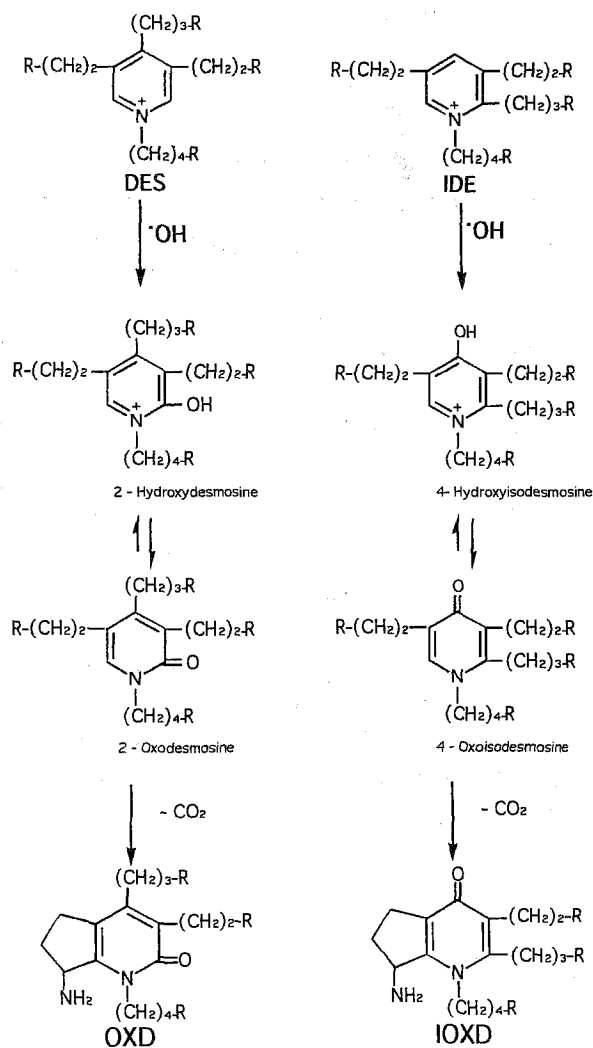


Fig. 12. Postulated mechanisms for the formation of OXD (left) and IOXD (right). R, side chain of amino acid.

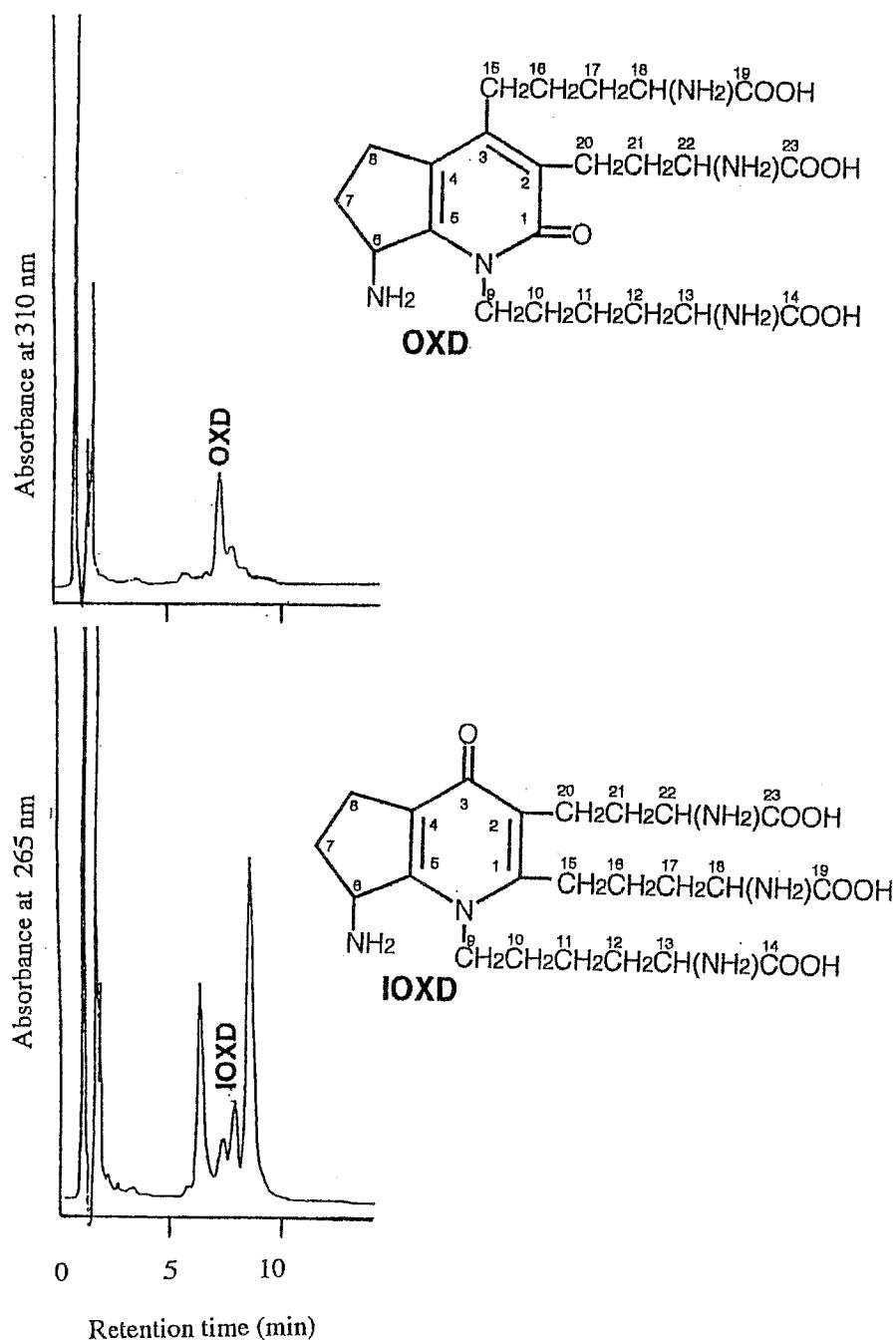


Fig. 13. Representative HPLC profiles of acid hydrolysates of bovine aorta elastin at each UV absorption maximum and structures of OXD (upper) and IOXD (lower). Bovine aorta elastin was hydrolyzed in 6 N HCl containing 3 % (w/v) phenol, was applied to a reverse-phase column (LiChrospher 100 RP-18 125 x 4) and subjected to analytical HPLC using as eluent of 0.1 M sodium phosphate buffer/acetonitrile (5:1) at pH 4.5.

TABLE 5  
OXD and IOXD contents in elastin from bovine tissues

	OXD*	IOXD*	OXD/DES (%)	IOXD/IDE (%)
Ligamentum nuchae	4.8	4.8	37	28
Spleen	2.6	2.1	38	28
Aorta	2.1	2.1	19	18
Lung	0.9	0.7	30	24

Note. \*Data are expressed in peak area ( $\times 10^5$ ) per mg of elastin. The value in the table represent the average of duplicate assays for two samples. Measurements were performed as described in Fig.13.

TABLE 6  
Effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration on DES, OXD, IDE, and IOXD contents in elastin by Cu<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (A), and Fe<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (B).

Conditions	DES	OXD	IDE	IOXD
Control	11.074 ±0.304	2.123 ±0.031	11.804 ±0.630	2.126 ±0.071
A, 5mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	9.826 ±0.181	1.741 ±0.128	10.354 ±0.370	1.405 ±0.036
A, 50mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	9.773 ±0.602	1.772 ±0.066	10.243 ±0.352	1.416 ±0.011
A, 500mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	9.826 ±0.181	1.499 ±0.066	8.895 ±0.825	1.597 ±0.092
B, 5mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10.639 ±0.189	2.169 ±0.102	10.647 ±0.340	1.893 ±0.014
B, 50mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10.525 ±0.417	2.593 ±0.361	10.405 ±0.708	1.765 ±0.082
B, 500mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	9.596 ±0.712	2.675 ±0.537	10.338 ±0.454	2.100 ±0.323

Note. (A) Solutions of elastin (5 mg/ml, pH 7.4) were incubated with 0.1 mM Cu<sup>2+</sup> and the concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indicated at 37°C for 24 hr. (B) Solutions of elastin (5 mg/ml, pH 7.4) were incubated with 0.5 mM Fe<sup>2+</sup> and the concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indicated at 37°C for 24 hr. Measurements were performed as described in Fig. 13. Data are expressed in peak area ( $\times 10^5$ ) per mg of elastin and represents the mean  $\pm$  S.D (n=5).

TABLE 7  
Effects of solution pH on DES, OXD, IDE, and IOXD contents in elastin  
by Cu<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (A), and Fe<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (B).

Conditions	DES	OXD	IDE	IOXD
Control	11.074 ±0.304	2.123 ±0.031	11.804 ±0.630	2.126 ±0.071
A, pH 6.8	8.002 ±0.169	0.259 ±0.039	6.858 ±0.278	ND <sup>a</sup>
A, pH 7.4	9.773 ±0.602	1.772 ±0.066	10.243 ±0.352	1.416 ±0.011
A, pH 8.4	10.283 ±1.095	2.842 ±0.217	10.640 ±0.689	1.767 ±0.061
B, pH 6.8	9.088 ±0.383	1.621 ±0.102	10.065 ±0.335	0.558 ±0.099
B, pH 7.4	10.525 ±0.417	2.593 ±0.361	10.405 ±0.708	1.765 ±0.082
B, pH 8.4	10.820 ±0.054	2.566 ±0.197	10.511 ±0.031	2.068 ±0.117

*Note.* (A) Solutions of elastin (5 mg/ml) were incubated with 0.1 mM Cu<sup>2+</sup> and 50 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at pH indicated at 37°C for 24 hr. (B) Solutions of elastin (5 mg/ml) were incubated with 0.5 mM Fe<sup>2+</sup> and 50 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at pH indicated at 37°C for 24 hr. Measurements were performed as described in Fig. 13. Data are expressed in peak area (×10<sup>-5</sup>) per mg of elastin and represents the mean ± S.D. (n=5). ND<sup>a</sup>, not detected.

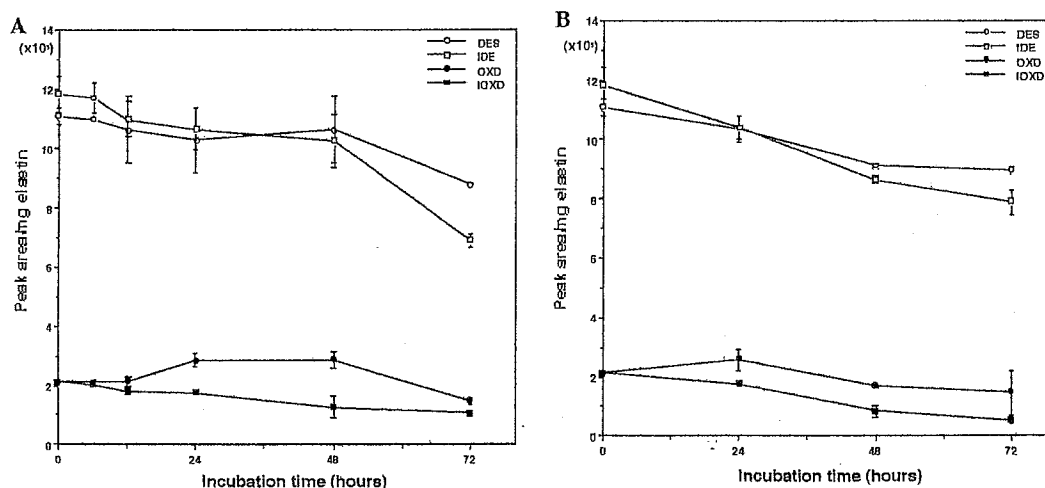


Fig. 14: Time-dependent changes of DES, IDE, OXD, and IOXD contents in elastin during incubation with Cu<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (A), and Fe<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (B). (A) Solutions of elastin (5 mg/ml, pH 8.4) was incubated with 0.1 mM Cu<sup>2+</sup> and 50 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 37°C for the times indicated on the abscissa. (B) Solutions of elastin (5 mg/ml, pH 7.4) was incubated with 0.5 mM Fe<sup>2+</sup> and 50 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 37°C for the times indicated on the abscissa. Measurements were performed as described in Fig. 13. Values shown are means ± S.D. of five independent determinations.



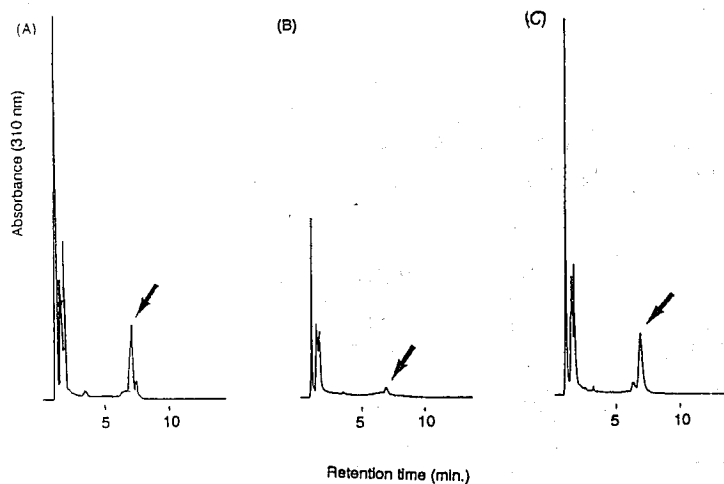


Fig. 15. **The formation of OXD in elastin after oxidation by  $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ .** Arrows indicate the peak of OXD. HPLC profile of elastin sample after oxidation by  $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$  (B,  $\text{Cu}^{2+}$ : 0.1 mM,  $\text{H}_2\text{O}_2$ : 50 mM, pH 6.8, 24hr), acid hydrolyzed elastin sample after oxidation by  $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$  (C,  $\text{Cu}^{2+}$ : 0.1 mM,  $\text{H}_2\text{O}_2$ : 50 mM, pH 8.4, 24hr), and acid hydrolyzed bovine aorta elastin (A). Measurements were performed as described in Fig. 13.

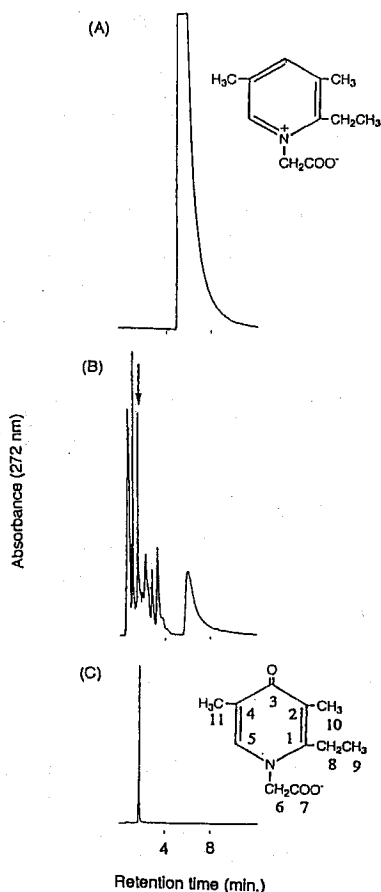


Fig. 17. **Formation of 4-pyridone from model compound of IDE by  $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ .** The inset (A) and (C) show the structures of the model compound of IDE and IOXD, 1-(1-carboxymethyl)-2-ethyl-3,5-dimethyl pyridinium betaine and 1-(1-carboxymethyl)-2-ethyl-3,5-dimethyl-4-oxopyridine, respectively. A; The model compound of IDE, 1-(1-carboxymethyl)-2-ethyl-3,5-dimethyl pyridinium betaine (2 g, 0.01 mol) was dissolved with 50 ml of distilled water. B; Solutions of model compound of IDE, 1-(1-carboxymethyl)-2-ethyl-3,5-dimethyl pyridinium betaine (2 g, 0.01 mol) were incubated with  $\text{Fe}^{2+}$  (0.5 mmol) and  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.05 mol) at  $37^\circ\text{C}$  for 24 hr, in a total volume of 50 ml of distilled water. The analytical HPLC for analysis of 1-(1-carboxymethyl)-2-ethyl-3,5-dimethyl-4-oxopyridine was performed on a reverse-phase column (LiChrospher 100 RP-18 125  $\times$  4 mm) using an eluent, acetonitrile/water (5:100). The flow rate was 1.0 ml/min.

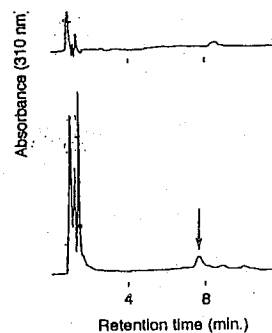


Fig. 16. **The formation of OXD from DES by Fenton reaction.** Solutions of DES (1.4  $\mu\text{mol}$ ) were incubated with  $\text{Fe}^{2+}$  (0.1  $\mu\text{mol}$ ) and  $\text{H}_2\text{O}_2$  (13  $\mu\text{mol}$ ) at  $37^\circ\text{C}$  for 12 hr, in a total volume of 0.5 ml of distilled water. Measurement of OXD was carried out according to conditions of Fig. 13. Arrow described in the lower part of this figure indicates the peak of OXD.

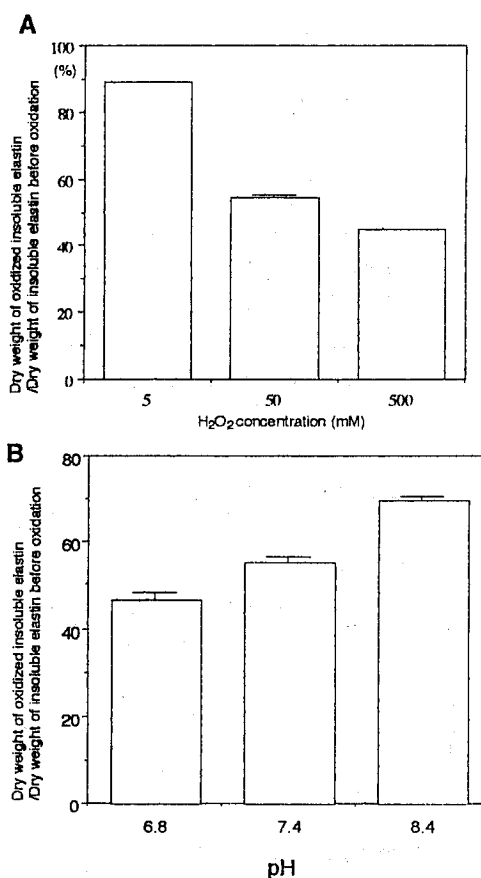


Fig. 18. **Effects of  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentration and solution pH on the solubilization of elastin by  $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ .** (A) Solutions of elastin (5 mg/ml, pH 7.4) were incubated with 0.1 mM  $\text{Cu}^{2+}$  and the concentration of  $\text{H}_2\text{O}_2$  indicated on the *abscissa* at  $37^\circ\text{C}$  for 24 hr under atmosphere. (B) Solutions of elastin (5 mg/ml) were incubated with 0.1 mM  $\text{Cu}^{2+}$  and 50 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  at pH indicated on the *abscissa* at  $37^\circ\text{C}$  for 24 hr under atmosphere. The value of solubilization of elastin was expressed in the percentage of dry weight of pre-oxidation to that of pre-oxidation. Values shown are means  $\pm$  S.D. of five independent determinations.

## 論文審査結果要旨

動物の細胞外マトリックス (ESM) における代表的なタンパク質であるエラスチンは、分子間および分子内でリジロキシターゼの作用を経る合目的な架橋形成反応が起こり、不溶性の高分子となって機能している。すなわち、ESMの架橋形成は動物の生体維持に必須の生理的反応である。したがって、架橋形成と架橋構造の先天のおよび後天的異常は、器官の形態形成異常や機能低下を誘因し、様々な疾患の原因になるばかりでなく、老化における器官の機能低下にも直接および間接的に関わっていると考えられる。

本研究は、新規なエラスチンの架橋アミノ酸を分離し、その構造と生成機構を明らかにする事を目的として行われた。その中で、牛項韌帯エラスチンより、新規な2種のピリジン環式架橋アミノ酸、デスモピリジンとイソデスモピリジンを発見し、その生成機構を検討する事によって、血中のアンモニアが架橋構築に関わる、チチバビン反応による異常アミノ酸であることが解明できた。その生成機構を調べるために、アリシンのビスクレゾール誘導体による定量法を開発した。一方、2種新規なオキソピリジン環式架橋アミノ酸、オキソデスモシンおよびイソオキソデスモシン、正常なピリジウム環式架橋アミノ酸残基酸化開裂の中間体であることを解明し、活性酸素種によるエラスチンの弱体化の原因となることを明らかにした。これらの反応は、動物の器官形成における必須の反応に干渉する異常架橋生成に関わっており、生命維持に極めて重要な意味を持つ発見である。これらのことは、応用生命化学分野において、高く評価される。よって、博士(農学)の学位を授与できるものと判定した。